



Rec'd PCT/ETC 28 APR 2005

PCT/JP 03/13767

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

2 7.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年10月28日

出願番号  
Application Number: 特願2002-313076  
[ST. 10/C]: [JP 2002-313076]

出願人  
Applicant(s): 独立行政法人農業生物資源研究所

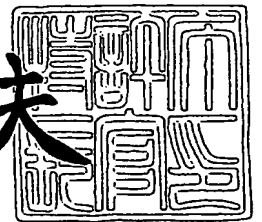
RECEIVED	
12 DEC 2003	
WIPO	PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3097963

【書類名】 特許願

【整理番号】 MOA-A0214

【提出日】 平成14年10月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市松代4丁目26-405-501

    【氏名】 三橋 忠由

【特許出願人】

    【識別番号】 501167644

    【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ブタについてRNAウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を  
知る方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インフルエンザウイルス抵抗性のブタを判定する方法であつて、ブタMx1遺伝子のエキソン上の配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の11bpの欠損を検出することを含む方法。

【請求項2】 以下の(a)～(c)の工程を含む、請求項1に記載の判定方法。

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) ブタMx1遺伝子のエキソンであつて配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程

(c) 増幅したDNAの塩基配列を決定する工程

【請求項3】 以下の(a)～(d)の工程を含む、請求項1に記載の判定方法。

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) 調製したDNAを制限酵素により切断する工程

(c) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程

(d) 検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する工程

【請求項4】 以下の(a)～(e)の工程を含む、請求項1に記載の判定方法。

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) ブタMx1遺伝子のエキソンであつて配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程

(c) 増幅したDNAを制限酵素により切断する工程

(d) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程

(e) 検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する工程

【請求項5】 以下の(a)～(e)の工程を含む、請求項1に記載の判定方法。

- (a) 被検ブタからDNAを調製する工程
- (b) ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程
- (c) 増幅したDNAを一本鎖に解離させる工程
- (d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程
- (e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

【請求項6】 以下の(a)~(d)の工程を含む、請求項1に記載の判定方法。

- (a) 被検ブタからDNAを調製する工程
- (b) ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程
- (c) 工程(b)で増幅したDNAを質量分析器にかけ、分子量を測定する工程
- (d) 工程(c)で測定した分子量を対照と比較する工程

【請求項7】 以下の(a)~(f)の工程を含む、請求項1に記載の判定方法。

- (a) 被検ブタからDNAを調製する工程
- (b) ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程
- (c) ヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程
- (d) 工程(b)のDNAと工程(c)の基板を接触させる工程
- (e) 該DNAと該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する工程
- (f) 工程(e)で検出された強度を対照と比較する工程

【請求項8】 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項1に記載の判定方法。

- (a) 被検ブタからタンパク質試料を調製する工程
- (b) 該タンパク質試料に含まれる、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の11bpが欠損した塩基配列によってコードされるブタMx1変異タンパク質の量を測定する工程

【請求項 9】 請求項 1 に記載の判定方法のための PCR プライマーであって、ブタ Mx 1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域を増幅するためのオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】 ブタ Mx 1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域、または 1964 位～1974 位が欠損した塩基配列を含む DNA 領域とハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】 ブタ Mx 1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11 bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx 1 変異タンパク質を認識する抗体。

【請求項 12】 請求項 9 もしくは 10 に記載のオリゴヌクレオチド、または請求項 11 に記載の抗体を含む、インフルエンザウイルス抵抗性ブタの判定用試薬。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、ブタについて RNA ウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法に関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

マウスからの知見で、Mx 遺伝子は、オルソミクソウイルスに属する（直鎖状 1 本鎖 RNA ウイルス）インフルエンザウイルス等の RNA ウイルスの増殖を抑制する（RNA 合成を阻害する）タンパク質を生産することが知られている。

##### 【0003】

豚には 2 つの Mx 遺伝子がありその一つが Mx1 遺伝子である。Mx1 遺伝子は 14 のエキソンから構成されている。梅山豚（メイシャントン；Meishan）の一部の個体はエキソン（exon）13 に 3bp（Ser）の欠損を持つ。また、ランドレース（Landra

ce)、デュロック (Duroc) 等の西洋で家畜化され、世界に広く用いられている  
ブタ品種の一部の個体は、最終エキソンに11塩基の欠損を持つ (非特許文献1参  
照)。

#### 【0004】

これまでにSTAFF研究所と本発明者のグループは協同で欠損型の存在とその存  
在割合を報告 (非特許文献1参照) しているが、その中で、世界で最も広く用い  
られているランドレース種にウイルス抑制能を持たない11塩基欠損型が高い頻度  
で認められた。ランドレース種は肥育生産用の3元交雑ブタ (図1写真) を作る  
のに広く用いられている。

#### 【0005】

一方、ニホンイノシシ、梅山豚など野生又は半野生の品種には11塩基欠損型は  
これまで見出されていない。

#### 【0006】

ランドレース種内でヘテロの存在割合に対してCホモ型が少ないこと、他の品  
種ではヘテロはいてもホモ型がないことから、Cのホモ型は生存に不利である  
、と推察される。なお、旧畜産試験場で2000年にランドレースを含む白色西洋品  
種約40頭を調査したときにはC/Cは1頭も存在していなかった。

#### 【0007】

また、1917年～1918年、スペイン風邪と呼ばれている、歴史に残る最大のイン  
フルエンザが全世界で流行した。全世界では2千万人から4千万人が死亡した。  
我が国でも30万人以上が死亡した。米国北西部から始まったスペイン風邪により  
、米国内でも約60万人が死亡した。そのとき、ブタの集団にも風邪が流行してい  
た、との報告がある。また、当時死亡した兵士の肺組織ホルマリン漬け・パラフ  
イン包埋試料から取り出したRNAウイルスの系統解析では、このインフルエンザ  
ウイルスはブタのものに非常に近い、と報告されている。

#### 【0008】

米国北西部、アイオワ州などは現在でも養豚が盛んな地域である。当時の養豚  
がどのような状況であったのか不明であるが、既にランドレース種やこれを交配  
した交雑種が集約的に飼われていたとしたら、インフルエンザウイルス感受性を

大きい割合で保持するブタ集団こそが、新たなウイルス発生の温床となり世界的疫病 (Pandemic) を流行させたと推察される。

#### 【0009】

家畜は定められた場所の限られた面積の中で高密度に飼養されている。高密度の飼養は、伝染性の疾病が一度発生すれば容易にその群内に広がり生産面で大きなダメージを与えることを意味する。また、高密度な家畜の飼養群はブタからヒトへのインフルエンザ伝搬の例が示すように、時には種を越えた新たな群へ疾病を伝搬する温床ともなる。このような危険を避けるために、現在では、疾病予防のワクチン接種が行われ、健全状態においてさえも抗生物質を混入した飼料が与えられている。このような予防措置をとっても、1998から2000年に米国で見られたような新型H3N2インフルエンザウイルス発生による豚生産の大きな損失等が起こりうる。また抗生物質の定常的な投与は、食肉中への抗生物質の残存の点から消費者にとっての「食の安全」に不安を与えるものである。しかし、これらの予防措置は、疾病による家畜の損失率を抑えるのに必要であるから行われているのである。現在の家畜の疾病抑制率を維持しつつあるいは向上させながら食の安全を守るには、家畜が潜在的にもつ疾病抵抗性を支配する遺伝情報の発見が必要であったが、そのような情報は発見されていなかった。

#### 【0010】

また、これまでのところ、ブタについてRNAウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知ることが可能な有効な方法は知られていなかった。

#### 【0011】

##### 【非特許文献1】

Morozumi T.ら著、「Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene.」、Biochemical Genetics.、2001年、Vol.39、p.251-260

#### 【0012】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、ブタについてRNAウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法を提供することにある。

## 【0013】

## 【課題を解決するための手段】

家畜の特定の系統あるいは個体は「生産性は低いが特定の病気には強い」という抗病性形質を遺伝的に保有している場合がある。このような抗病性形質を生産性の高い系統へと引き継がせることができれば「生産性も高く病気にも強い」系統の作出が可能になり、必要とされた投薬量も減少する。遺伝する形質の分子レベルでの本体の究明はこれまで困難であったが、分子遺伝学の発展により、ヒトやマウスにおける多くの遺伝的形質について本体の究明が急速に進んでいる。家畜においてもこのような遺伝分子情報の中で、特定の疾病に対する抵抗性との関係が明らかにされるなら、当該遺伝情報を用いて抵抗性の家畜を選抜・育種をすることができる。

## 【0014】

発明者はかつての研究の中で、家畜化されたブタの中には、ミクソウイルスの増殖を抑えるMx1タンパクをコードする遺伝子に11塩基の欠損を持つ個体が存在することを明らかにしていた（論文として公表済み）。その後、欠損型をヘテロで持つ個体の割合に比べ欠損型をホモで持つ個体の割合が低いことに思い当たった。また、養豚の現場から、ブタが呼吸器系の疾病に弱いこと、そのことが子豚の生産に大きく影響していることを知っていた。そこで、Mx1遺伝子において、ミクソウイルスの1種であるインフルエンザウイルスの増殖抑制能が11塩基の欠損にどのように影響されるかについて研究を行い、11塩基欠損型はウイルス増殖抑制能を全く失っていることを明らかにし、本発明に至った。

## 【0015】

より詳細には、最終エキソン に11bp の欠損を持つMx1遺伝子では、11bpの欠損によって3塩基が1単位となるコドンがずれ、終止コドンが大きく後方へシフトし、下流でアミノ酸配列が大きく異なるため、Mx1タンパク質は正常型（野生型）のそれと分子量も構造も大きく異なる。従って、ウイルス抑制能を失っている可能性が考えられた。

## 【0016】

そこで、本発明者は、Mx1遺伝子正常型（野生型）、エキソン13の3塩基（3bp



）欠損型、最終エキソンの11塩基（11bp）欠損型、ベクターのみを、マウス3T3細胞（Mx1活性をもたない）に導入し、インフルエンザウイルスA型の感染試験を行った。

#### 【0017】

その結果、11bp欠損型はウイルス増殖抑制能を全く失い（図2の最も左の矢印）、ベクターのみ導入と同じようにウイルスが、野生型に比べ10から100倍の増殖を示した。さらに、3bp欠損型では野生型と同じようなウイルス増殖カーブを示し、ウイルス抑制能に影響がなく、ウイルス抑制能を保持していた（図2の最も右の矢印）。なお、ウイルス感染濃度はもう1段階低いレベル（MOI 1）でも行い、同様の結果を得た。

#### 【0018】

特に世界中で広く用いられている家畜豚の中には、ウイルス抑制能を持たないMx1遺伝子を保有している個体があり、本発明における実験結果から、RNAウイルスの侵害に対する初期防衛能に大きな問題があることが予想される。

#### 【0019】

すなわち、ブタMx1の当該部分の遺伝子配列型を知ることにより、ブタについてRNAウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知ることができる。さらに、Mx1の11塩基欠損型の除去は、家畜の健康のみでなく人類に対する新たなインフルエンザウイルス発生の脅威を除くためにも重要であると考えられる。

#### 【0020】

即ち本発明は、ブタについてRNAウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法に関し、より詳しくは、

〔1〕 インフルエンザウイルス抵抗性のブタを判定する方法であって、ブタMx1遺伝子のエキソン上の配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の11bpの欠損を検出することを含む方法、

〔2〕 以下の（a）～（c）の工程を含む、〔1〕に記載の判定方法、

（a）被検ブタからDNAを調製する工程

（b）ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程

(c) 増幅したDNAの塩基配列を決定する工程

[3] 以下の(a)～(d)の工程を含む、[1]に記載の判定方法、

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) 調製したDNAを制限酵素により切断する工程

(c) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程

(d) 検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する工程

[4] 以下の(a)～(e)の工程を含む、[1]に記載の判定方法、

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程

(c) 増幅したDNAを制限酵素により切断する工程

(d) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程

(e) 検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する工程

[5] 以下の(a)～(e)の工程を含む、[1]に記載の判定方法、

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程

(c) 増幅したDNAを一本鎖に解離させる工程

(d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程

(e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

[6] 以下の(a)～(d)の工程を含む、[1]に記載の判定方法、

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する工程

(c) 工程(b)で増幅したDNAを質量分析器にかけ、分子量を測定する工程

(d) 工程(c)で測定した分子量を対照と比較する工程

[7] 以下の(a)～(f)の工程を含む、[1]に記載の判定方法、

(a) 被検ブタからDNAを調製する工程

(b) ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列にお

ける 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する工程

(c) ヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程

(d) 工程 (b) の DNA と工程 (c) の基板を接触させる工程

(e) 該 DNA と該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する工程

(f) 工程 (e) で検出された強度を対照と比較する工程

[8] 以下の (a) および (b) の工程を含む、[1] に記載の判定方法、

(a) 被検ブタからタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号: 1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質の量を測定する工程

[9] [1] に記載の判定方法のための PCR プライマーであって、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号: 1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域を増幅するためのオリゴヌクレオチド、

[10] ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号: 1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域、または 1964 位～1974 位が欠損した塩基配列を含む DNA 領域とハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド、

[11] ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号: 1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質を認識する抗体、

[12] [9] もしくは [10] に記載のオリゴヌクレオチド、または [11] に記載の抗体を含む、インフルエンザウイルス抵抗性ブタの判定用試薬、を提供するものである。

## 【0021】

### 【発明の実施の形態】

本発明は、インフルエンザウイルス抵抗性のブタを判定する方法であって、ブタ Mx1 遺伝子のエキソン上の配列番号: 1 に記載の塩基配列における 2064

位～2074位の11bpの欠損を検出することを含む方法を提供する。

#### 【0022】

上記Mx1遺伝子の最終エキソンの塩基配列を配列番号：1に、該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。当該配列は、当業者においては、PubMedアクセッション番号M65087によって容易に取得することが可能である。

#### 【0023】

本発明において「欠損」している11bpは、Mx1遺伝子の最終エキソン上の配列5'-gg cgc cgg ctc-3'であり、配列番号：1においては、2064～2074位の塩基領域に相当する。

#### 【0024】

本発明においては、被検ブタについてMx1遺伝子の最終エキソンにおいて上記の「11bpの欠損」がヘテロ型として検出された場合に、被検ブタはインフルエンザ抑制能を持たないMx1タンパク質を持っていると判断される。また上記の「11bpの欠損が」ホモ型として検出された場合、被検ブタの細胞はインフルエンザ抑制能を持たないMx1タンパク質しか持たないと判断され、このことから、当該被検ブタはインフルエンザウイルスに高い感受性を示すと判断される。前記「11bpの欠損」が検出されない場合に、被検ブタはインフルエンザウイルスに抵抗性であるものと判断される。

#### 【0025】

本発明の判定方法において、ブタMx1遺伝子の最終エキソンの上記「11bpの欠損」を検出する方法（手段）は、上記「欠損」を検出可能な方法（手段）であれば特に制限されるものではないが、例えば、被検ブタのMx1遺伝子の上記欠損部位を含む最終エキソンの塩基配列を直接決定することにより行うことができる。

#### 【0026】

この方法においてはまず、被検ブタからDNA試料を調製する。DNA試料は、例えば被検ブタの臓器、または組織、あるいは細胞や血液、口腔粘膜、皮膚、毛等から抽出した染色体DNAを基に、あるいはイントロンを含まないcDNAもしくはmRNA

を基に調製することができる。

#### 【0027】

本方法においては、次いで、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを単離する。該DNAの単離は、ブタMx1遺伝子の最終エキソンにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNA、あるいはRNAを鋳型としたPCR等によって行うことも可能である。本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。単離したDNAの塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。

#### 【0028】

本方法においては、次いで、決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する。本方法における対照とは、正常な（野生型）ブタMx1遺伝子の配列（例えば、配列番号：1）を言う。

#### 【0029】

本発明の判定方法は、上記の如く直接被検ブタ由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外に、上記「欠損」の検出が可能な種々の方法によって行うことができる。

#### 【0030】

例えば、本発明における上記「欠損」の検出は、以下のような方法によっても行うことができる。

#### 【0031】

まず、被検ブタからDNA試料を調製する。次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検ブタからDNA試料を調製する。次いで、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。

## 【0032】

このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP) を利用した方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異 (欠損) が存在する場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分をPCR法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体DNAをこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプロープDNAを用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノムDNA以外にも被検ブタから調製したRNAを逆転写酵素でcDNAにし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロッティングを行うことも可能である。また、このcDNAを鋳型としてPCRでブタMx1遺伝子のエクソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列を含むDNAを増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

## 【0033】

さらに別の方法においては、まず、被検ブタからDNA試料を調製する。次いで、ブタMx1遺伝子のエクソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

## 【0034】

該方法としては、例えばPCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1;

6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with post-labeling.、PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数のDNA試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖DNAが異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖DNAの高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することによりDNA断片に欠損等による変異が存在することを検出することができる。

#### 【0035】

具体的には、まず、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAをPCR法等によって増幅する。増幅される範囲としては、通常200～400bp程度の長さが好ましい。PCRは、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCRの際に、<sup>32</sup>P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、増幅DNA産物を標識することができる。あるいはPCR反応液に<sup>32</sup>P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えてPCRを行うことにより、増幅DNA産物を標識することも可能である。さらに、PCR反応後にクレノウ酵素等を用いて、<sup>32</sup>P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅DNA断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識DNA断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5から10%程度）のグリセロールを添加することにより、DNA断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各DNA断片の性質により変動するが、通常、室温（20から25℃）で行い、好ましい分離が得られないときには4から30℃までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DN

A断片の移動度を、X線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCRによって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識したDNAを使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

#### 【0036】

さらに別の方法は、まず、被検ブタから調製したブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNA、および該DNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板、を提供する。次いで、該DNAと該基板を接触させる。さらに、基板に固定されたヌクレオチドプローブにハイブリダイズしたDNAを検出することにより、上記「欠損」を検出する。

#### 【0037】

このような方法としては、DNAアレイ法が例示できる。被検ブタからのブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNA試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。該DNA試料の調製の好ましい態様においては、例えば被検ブタの血液、皮膚、口腔粘膜等の組織または細胞から抽出した染色体DNAを基に調製することができる。染色体DNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えばブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNAを鋳型としたPCR等によってブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを調製することも可能である。調製したDNA試料には、必要に応じて、当業者に周知の方法によって検出のための標識を施すことができる。

#### 【0038】

本発明において「基板」とは、ヌクレオチドを固定することが可能な板状の材



料を意味する。本発明においてヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。本発明の基板は、ヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般にDNAアレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。

#### 【0039】

一般にDNAアレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらのDNAは非透過性(non-porous)の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することができる。

#### 【0040】

本発明において、ヌクレオチドの固定(アレイ)方法として、Affymetrix社開発によるオリゴヌクレオチドを基本としたアレイが例示できる。オリゴヌクレオチドのアレイにおいて、オリゴヌクレオチドは通常インサイチュ(in situ)で合成される。例えば、photolithographicの技術(Affymetrix社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット(Rosetta Inpharmatics社)技術等によるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。

#### 【0041】

基板に固定するヌクレオチドプローブは、上記「欠損」を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、野生型のブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列を含むDNA、あるいはブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列が欠損したDNAと特異的にハイブリダイズするようなプローブである。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、検出するブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列を含むDNA、またはブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位~2074位の塩基配列が欠損したDNAに対し、完全に相補的である必要はない。

## 【0042】

本発明において基板に結合させるヌクレオチドプローブの長さは、オリゴヌクレオチドを固定する場合は、通常10～100ベースであり、好ましくは10～50ベースであり、さらに好ましくは15～25ベースである。

## 【0043】

本発明においては、次いで、該cDNA試料と該基板を接触させる。本工程により、上記ヌクレオチドプローブに対し、DNA試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

## 【0044】

本発明においては、次いで、該DNA試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの有無または強度を検出する。この検出は、例えば、蛍光シグナルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNAアレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定したDNAをプローブといい、一方溶液中のラベルしたDNAをターゲットという。従って、基板に固定された上記ヌクレオチドを、本明細書においてヌクレオチドプローブと記載する。

## 【0045】

上記の方法以外にも、特定位置の欠損のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異 (欠損) が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料DNAでハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンプロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。また、リボヌクレアーゼAミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号: 1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAをPCR法等によって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだMx1遺伝子最終エキソンcDNA等か

ら調製した標識RNAとハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼAによって切断し、これをオートラジオグラフィー等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

#### 【0046】

さらに別の方法においては、まず、被検ブタからDNAを調製し、次いで、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNAを増幅する。次いで、増幅したDNAを質量分析器にかけ、分子量を測定する。次いで、測定した分子量を対照と比較する。このような方法としては、例えば、MALDI-TOF MS法(Trends Biotechnol. (2000):18:77-84)等が挙げられる。

#### 【0047】

本発明の上記検査方法の別つの態様は、ブタMx1遺伝子の最終エキソンの発現産物を指標とすることによって検査を行う方法である。ここで「発現」とは、転写および翻訳が含まれる。従って、「発現産物」には、mRNAおよびタンパク質が含まれる。

#### 【0048】

本発明は、ブタMx1遺伝子の最終エキソンの発現産物を検出することを特徴とする、インフルエンザウイルス抵抗性のブタを判定する方法を提供する。該方法の好ましい態様においては、まず、被検ブタからタンパク質試料を調製し、該タンパク質試料に含まれる、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の11bpが欠損した塩基配列によってコードされるブタMx1変異タンパク質の量を測定する。

#### 【0049】

このような方法としては、SDSポリアクリルアミド電気泳動法、並びにブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の11bpが欠損した塩基配列によってコードされるブタMx1変異タンパク質を認識する抗体を用いた、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、および免疫蛍光

法を例示することができる。

#### 【0050】

上記の方法によって、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の11bpが欠損した塩基配列によってコードされるブタMx1変異タンパク質が検出された場合に、被検ブタはインフルエンザウイルス非抵抗性であるものと判定される。一方、上記変異タンパク質が検出されない場合に、被検ブタはインフルエンザウイルス抵抗性であるものと判定される。

#### 【0051】

以上、種々の検出方法を例示したが、これらに特に限定されるものではない。

#### 【0052】

本発明はまた、本発明のインフルエンザウイルス抵抗性のブタを判定する方法に用いるための判定用試薬を提供する。

#### 【0053】

その一つの態様は、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNA領域、または1964位～1974位が欠損した塩基配列を含むDNA領域とハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、判定試薬である。

#### 【0054】

該オリゴヌクレオチドは、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNA領域、または1964位～1974位が欠損した塩基配列を含むDNA領域に特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、サムブルックら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989に記載の条件）において、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該オリゴ

ヌクレオチドは、検出する上記塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。

#### 【0055】

該オリゴヌクレオチドは、本発明の判定方法におけるプローブやプライマーとして用いることができる。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15bp～100bpであり、好ましくは17bp～30bpである。プライマーは、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNA領域を増幅しうるものであれば、特に制限されない。該プライマーとしては、例えば、後述の実施例に記載された配列番号：9または10で示される配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられるが、このオリゴヌクレオチドに特に限定されるものではない。

#### 【0056】

また、本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合、該プローブは、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の塩基配列を含むDNA領域、または1964位～1974位が欠損した塩基配列を含むDNA領域の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも15bp以上の鎖長を有する。

#### 【0057】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得されるの二本鎖DNA断片として作製することもできる。

#### 【0058】

本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を<sup>32</sup>Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして<sup>32</sup>P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法

等)を例示することができる。

#### 【0059】

本発明の検査薬の他の一つの態様は、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の11bpが欠損した塩基配列によってコードされるブタMx1変異タンパク質を認識する抗体を含む、判定試薬である。該抗体は、本発明の方法に用いることが可能な抗体であれば、特に制限はないが、例えばポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が挙げられる。抗体は必要に応じて標識される。

#### 【0060】

ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列における2064位～2074位の11bpが欠損した塩基配列によってコードされるブタMx1変異タンパク質を認識する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして取得することができる。ブタMx1変異タンパク質、あるいはGSTとの融合タンパク質として大腸菌等の微生物において発現させたりコンビナントブタMx1変異タンパク質、またはその部分ペプチドをウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、ブタMx1変異タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、ブタMx1変異タンパク質若しくはその部分ペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、該細胞とマウスミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどの試薬を用いて融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、ブタMx1変異タンパク質に結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、ブタMx1変異タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

## 【0061】

上記の判定試薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

## 【0062】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

## 【0063】

ブタ品種MeishanとLandraceで判明したMx1遺伝子における変異は、その発現タンパク質の機能に影響があるのか否かを検討した。

## 【0064】

具体的には、正常及び変異のあるMx1遺伝子を強制発現させた細胞を用い、インフルエンザウイルス（Influenza virus）による感染実験を行い、Mx1遺伝子の変異が感染防御機能に影響を及ぼすか否かを検証した。

## 【0065】

〔実施例1〕 MeishanとLandraceの正常型と変異型のMx1遺伝子のcDNAクローニング

Meishan 39頭、Landrace 36頭よりEDTA血5mlを採取し、RPMI1640(GIBCO)培地で2倍に希釈し、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) に重層後、400 x gで40分間遠心を行い、リンパ球層を分離・採取し、phosphate buffered saline (PBS) で3回洗浄し、リンパ球を調製した。これらのリンパ球のDNAzol Reagent (GIBCO) 処理によりDNAを精製した。これらのDNAを鋳型に、Meishanはエキソン13をプライマー対（5'-CTGAAAGATCTCGGCTATGGAGG-3'／配列番号：3、5'-AAGAAGCTGAGACGTCGATCCGGCT-3'／配列番号：4）で、Landraceは最終エキソンをプライマー対（5'-AAGCGCATCTCCAGCCACATC-3'／配列番号：5、5'-AAGACATTGGGCGTGAAAGG-3'／配列番号：6）で、それぞれPCR（94℃5分間、94℃30秒、55℃30秒、72℃1分を40サイクル、72℃5分）により増幅した。エキソン13はダイレクトシーケン

スにより変異の有無を判定した。最終エキソンはNal I の37℃ 2時間処理によるRFLPで変異の検出を行った。

#### 【0066】

正常型と変異型を同定した個体より、20ml のEDTA血を採取し、リンパ球を調製、10%子牛血清 (FBS) 加 RPMI 1640培地に浮遊させ、一晚37℃、炭酸ガス培養器で培養した後、ヒトIFN $\alpha$  (Calbiochem) 500Uで3時間処理し、処理リンパ球よりRNAを精製した。このRNAを鋳型にし、プライマー対AttB1mxF (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTACACGCGTCA AAGAAAAGGAAG-3' / 配列番号: 7)、attB2mxR (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTCTATGATGCTATGCGG-3' / 配列番号: 8)を用い、RT-PCRでMx1遺伝子を増幅した。このPCR産物をGateway Cloning Technology (GIBCO) のベクターpDONR201と混合後、BP Clonase (GIBCO)処理を25℃で1時間行った。このBP反応液をコンピテントセルDH5 $\alpha$ に型どおりトランスフォームし、選択はカナマイシン (kanamycin) を50 $\mu$ g/ml含有のLB培地 (plates)で行った。各クローンのインサートの確認は、attB1mx-F及びattB2mx-Rを用い、コロニーPCR (94℃ 2分間、94℃30秒、64℃30秒、72℃3分を30サイクル、72℃5分)を行い、このPCR産物のダイレクトシーケンスにより行った。正常Mx1遺伝子のcDNAクローンをpEntmx1、Meishan型をpEntmx1-3、Landrace型をpEntmx1-11とした。

#### 【0067】

〔実施例2〕各Mx1遺伝子の発現ベクターの構築

pEntmx1、pEntmx1-3、pEntmx1-11の組み換え体クローンを、それぞれ15mlのLB培地に移植し、37℃、一晚振とう培養後、アルカリ法によりプラスミドDNAを精製した。これらプラスミドDNAとpDEST12.2 (GIBCO)を混合し、LR Clonase (GIBCO)で25℃、60分処理を行った後、DH5 $\alpha$ コンピテントセルにトランスフォームし、100 $\mu$ g/mのアンピシリン含有のLB培地で選択を行った。各組み換え体クローンよりプラスミドDNAを精製し、pExmx1、pExmx1-3、pExmx1-11とした。インサートの確認は、attB1mx-F及びattBmx-Rを用いたコロニーPCR産物のダイレクトシーケンスにより行った。

#### 【0068】



## 〔実施例 3〕 各Mx1遺伝子による形質転換体の構築

NIH3T3細胞の継代維持は、7% FBS 加Dulbecco's modified MEM (DMEM、GIBCO)で行った。pExmx1、pExmx1-3、pExmx1-11を5 $\mu$ g ずつ、および4 x 10<sup>6</sup>/0.4ml の3T3細胞と混合し、2mm 幅のキュベットに入れ、100 $\mu$ F、13 ohm、200v、1kv/cm でエレクトロポレーションを行った。各細胞は4日間培養後、G418 (Geneticin, GIBCO) を500 $\mu$ g/ml の濃度で加えたDMEMで培養し、形質転換体の選択を行った。pExmx1による形質転換体を3T3-0、pExmx1-3 による形質転換体を3T3-3、pExmx1-11による形質転換体を3T3-11とした。

## 【0069】

## 〔実施例 4〕 インフルエンザウイルスの調製

インフルエンザウイルス (Aichi, H2N2) は卵令 11 日のSPF卵の尿液腔内に接種し、37℃で2日間培養した後、一晚4℃に静置してから尿液を採取した。尿液を、3500 rpmで20分間遠心し、その上清を種ウイルス液とし分注後、-80℃で保存した。種ウイルスの力価は、10<sup>7.5</sup> EID<sub>50</sub> (50% Egg-Infective Dose )/0.2mlであった。

## 【0070】

## 〔実施例 5〕 インフルエンザウイルスの感染実験

各Mx1遺伝子の強制発現によりウイルスの増殖に影響があるのか否かの検討を、感染させるウイルス量を変えて行った。

## 【0071】

3T3、3T3-0、3T3-3、3T3-11をそれぞれ細胞濃度 5 x 10<sup>4</sup>/ml に調製し、24-well plate に 1ml/wellで植え込み、37℃の炭酸ガスふらん器で2日間培養した。各細胞をPhosphate buffered saline (PBS) で1回洗浄後、PBSで種ウイルスを10倍希釈 (MOI:multiplicity of Infection 10に相当) 及び100倍希釈 (MOI 1に相当) したウイルス液を接種し、37℃で1時間吸着を行った。未吸着ウイルスはPBSで2回細胞面を洗浄し除去した後、DMEMを2ml 加え培養した。採材は、0、6、12、18、24、30、36、48、54時間後に行い、採取した培養上清を2500 rpmで5分間遠心し、その上清を力価測定まで -80℃に保存した。

## 【0072】

経時的に採取した上清中のウイルスの力価測定は、PBSでそれぞれ10倍段階希釈したウイルス液を各希釈について2個の11日卵に、0.2mlずつ尿液腔内接種をし、2日間培養後、一晚4℃に静置し、その尿液のニワトリ赤血球凝集能の有無により判定した。

#### 【0073】

その結果、MOI 1の場合、3T3、3T3-11においては、ウイルス感染後18時間より培養上静中に増殖ウイルスの放出が認められ、ピークは36時間後で2.8-3.0 EID<sub>50</sub>/0.2ml のウイルス増殖が認められた。一方、3T3-0及び3T3-3では、36～48時間後に1.0 EID<sub>50</sub>/0.2ml のウイルス増殖が認められたが、それ以上の増殖は認められず、3T3、3T3-11におけるウイルス増殖と明らかな差が観察された(図2)。

#### 【0074】

MOI 10の場合、3T3、3T3-11においては、ウイルス感染12時間後より培養上静中に0.3-0.5 EID<sub>50</sub>/0.2ml の感染性ウイルスが検出され、36時間後には4.5-4.7 EID<sub>50</sub>/0.2ml の最大増殖が認められた。3T3-0及び3T3-3では、24時間後に0.5 EID<sub>50</sub>/0.2ml、48時間後に2.7-2.8 EID<sub>50</sub>/0.2ml の感染性ウイルスが検出されたが、やはりそれ以上の増殖は認められず、明らかにウイルスの増殖が抑制された(図3)。

#### 【0075】

インフルエンザウイルスはRNAウイルスであるので、各3T3細胞に感染させたことによりマウスIFN $\alpha$ が産生され、ウイルスの増殖に影響を与える可能性がある。そこで、各3T3細胞を抗マウスIFN $\alpha$ を加えた培地で12日間継代維持した後、MOI 10でのウイルス感染実験を行った。採材は36時間後に行い、培養上清中のウイルス力価測定をした結果、抗マウスIFN $\alpha$ を処理していない細胞群と同様のウイルス増殖結果を得た。このことより、ウイルスの増殖に影響を与えた因子は、導入したプタMx1遺伝子であると考察された。

#### 【0076】

〔実施例6〕各形質転換細胞におけるMx1の発現量の比較検討

各細胞におけるウイルス増殖の差が、Mx1の発現を反映したものであるのか否かを検討するため、感染に用いた各細胞のRNAを用い、RT-PCRを行った。

## 【0077】

3T3、3T3-3、3T3-11をそれぞれ細胞濃度  $2 \times 10^6/\text{ml}$  に調製し、RNAを抽出・精製し、RT-PCRによりMx1の発現量を測定した。用いたプライマー対は、AttB1mx F、AttB2mxRで、反応条件は55℃・30分、94℃・2分の後、94℃・15秒、58℃・30秒、68℃・3分を40 サイクル行った後、72℃・5分の伸長をした。定量のための外部標準に、マウスG3HPD( TOYOBO ) を増幅し発現量の陽性コントロールとした。陰性コントロールは、鋳型DNAの代わりに蒸留水を加えたものとした。

## 【0078】

その結果、3T3ではブタMx1 の発現はなく(図4、レーン1)、3T3-0、3T3-11、3T3-3では、3T3-11 においてやや発現量が多い傾向が認められたが、それぞれにおいてブタMx1の発現が認められた(図4、レーン3、4、5)。内部標準のマウスG3PDHの発現量より、各細胞間で採材した細胞数に大きな差はなく、3T3-0、3T3-11、3T3-3 では、ほぼ等量のそれぞれの Mx1 タンパク質が産生されていることが示唆された。

## 【0079】

〔実施例7〕 PCR増幅によるブタMx1遺伝子最終エクソンにおける11塩基欠損の検出

以下のプライマーセットを用いて、被検ブタについてPCRを行った。増幅部分は、PubMedアクセッション番号M65087の配列における1981位～2160位である(図5)。

- ・プライマーF: 5'- AGT GAC AGG AGC GAC AAG AG -3' (配列番号: 9)
- ・プライマーR: 5'- CCT GGA GAG TCC GGT TCA -3' (配列番号: 10)

## 【0080】

PCRの条件は、1) 94℃ 10分; 2) 94℃ 30秒, 60℃ 30秒, 72℃ 1分; 3) 72℃ 5分である。次いで、PCR産物2マイクロリットルを6%PAGE、200Vで1時間電気泳動し、銀染色を行った(図6)。PCR産物は野生型の場合は、105bpであり、11bpの欠損を含む場合は94bpである。サイズマーカーは、fX174/HaeIIIを用いた。

## 【0081】

図6で示すように、上記のプライマーセットを用いたPCRにより、11bpの欠損

を検出することができた。

#### 【0082】

##### 【発明の効果】

世界中で広く用いられている家畜豚の中には、ウイルス抑制能を持たないMx1遺伝子型を保有している個体がいる。このような個体はRNAウイルスの侵害に対する初期防衛能に大きな問題があると予想される。

#### 【0083】

##### 〔遺伝的抗病性能力測定技術の簡易化〕

これらのブタ集団うちからウイルス抑制能を持つ野生型遺伝子を保有する個体を、ブタの血液、肉片、毛根等DNAを含む組織を少量採取し、そのDNA抽出物から本発明対象であるMx1遺伝子型を調べることにより、選抜することができる。あるいは、望ましくない遺伝子型を保有する個体を淘汰することができる。

#### 【0084】

##### 〔ブタの生産性向上〕

本発明により、インフルエンザウイルスを含むRNAウイルス由来の疾病に対し、遺伝的抗病性の強弱を知ることができる。このことにより生産により望ましい健常な個体が選抜できる。また、子豚の呼吸器病罹患率が低下し、生存率、成長率が上昇する。

#### 【0085】

##### 〔ヒトに対して〕

インフルエンザ増殖抑制能の弱いブタ個体の群はインフルエンザに感染しやすく、ブタ群が死滅しない場合には、インフルエンザウイルスは遺伝的変異を伴いながら、時には新種のインフルエンザウイルスとなり増殖する。1917から1918に流行し、世界で4千万人以上、国内だけでも30万人以上の命を奪ったスペイン風邪のインフルエンザウイルスように、新種のインフルエンザウイルスはヒトへと感染するならば甚大な被害をもたらす。本発明によって、インフルエンザウイルス増殖抑制能の高いブタが選抜されることにより、ブタ群内でのインフルエンザウイルス増殖を抑制され新種インフルエンザウイルス発生の可能性が低下し、人類への脅威の1つを回避する可能性が高くなる。

【 0 0 8 6 】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; National Institute of Agrobiological Sciences

<120> Method to estimate the inherited resistance and susceptibility  
to RNA virus disease in pigs

&lt;130&gt; MOA-A0214

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2545

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (101)..(2092)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polyA\_signal

<222> (2517)..(2522)

<400> 1

gtaagtgtgg gagaacagcc ctgcatttct gctgacgggt caacgtcaca gcgtcaaaga 60

aaaggaaggt acatttcagc tgaactgatc aaggaggaag atg gtt tat tcc agc 115

Met Val Tyr Ser Ser

1 5

tgt gaa agt aaa gaa cct gat tca gtt tct gca tcc aat cac ctg tta 163

Cys Glu Ser Lys Glu Pro Asp Ser Val Ser Ala Ser Asn His Leu Leu

10 15 20

cta aat ggg aat gat gaa ttg gtg gag aaa agt cac aaa aca ggg cct 211

Leu Asn Gly Asn Asp Glu Leu Val Glu Lys Ser His Lys Thr Gly Pro

25 30 35

gag aac aac ctg tac agc cag tac gag gag aaa gtg cgg ccc tgc atc 259

Glu Asn Asn Leu Tyr Ser Gln Tyr Glu Glu Lys Val Arg Pro Cys Ile

40 45 50

gac ctc atc gac tca ctg cgg gcc ctg ggc gtg gag cag gac ctg gcc 307

Asp Leu Ile Asp Ser Leu Arg Ala Leu Gly Val Glu Gln Asp Leu Ala

55 60 65

ctg ccc gcc atc gcc gtc atc ggg gac cag agt tcg ggc aag agc tcc 355

Leu Pro Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gln Ser Ser Gly Lys Ser Ser

70 75 80 85

gtg ctg gag gcc ctg tcg ggg gtc gct ctc ccc aga ggc agc gga att 403  
 Val Leu Glu Ala Leu Ser Gly Val Ala Leu Pro Arg Gly Ser Gly Ile  
 90 95 100

gtg aca aga tgc cct ctt gtg ctg aaa ttg aaa aaa ctc gtg aac gaa 451  
 Val Thr Arg Cys Pro Leu Val Leu Lys Leu Lys Lys Leu Val Asn Glu  
 105 110 115

gaa gac gaa tgg aag ggc aaa gtc agt tac cgg gac agc gag att gag 499  
 Glu Asp Glu Trp Lys Gly Lys Val Ser Tyr Arg Asp Ser Glu Ile Glu  
 120 125 130

ctt tca gat gct tcg cag gtg gaa aag gaa gtc agc gca gcc cag att 547  
 Leu Ser Asp Ala Ser Gln Val Glu Lys Glu Val Ser Ala Ala Gln Ile  
 135 140 145

gcc atc gct ggg gaa ggc gtg gga atc agt cat gag cta atc agt ctg 595  
 Ala Ile Ala Gly Glu Gly Val Gly Ile Ser His Glu Leu Ile Ser Leu  
 150 155 160 165

gag gtc agc tcc cct cat gtc cca gat ctg acc ctc ata gac ctt cct 643  
 Glu Val Ser Ser Pro His Val Pro Asp Leu Thr Leu Ile Asp Leu Pro  
 170 175 180

ggc atc acc agg gta gct gta ggc aat cag cca tac gac atc gaa tac 691  
 Gly Ile Thr Arg Val Ala Val Gly Asn Gln Pro Tyr Asp Ile Glu Tyr  
 185 190 195

cag atc aag tct ctg atc aag aag tac atc tgt aag cag gag acc atc 739

Gln Ile Lys Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Cys Lys Gln Glu Thr Ile  
200 205 210

aac ttg gtg gtg gtc ccc tgt aac gtg gac att gcc acc acg gag gcg 787  
Asn Leu Val Val Val Pro Cys Asn Val Asp Ile Ala Thr Thr Glu Ala  
215 220 225

ctg cgc atg gcc cag gag gtg gac ccc gaa gga gac agg acc atc ggg 835  
Leu Arg Met Ala Gln Glu Val Asp Pro Glu Gly Asp Arg Thr Ile Gly  
230 235 240 245

atc ttg acg aag ccg gat ctg gtg gac aaa ggc act gag gac aag ata 883  
Ile Leu Thr Lys Pro Asp Leu Val Asp Lys Gly Thr Glu Asp Lys Ile  
250 255 260

gtg gac gtg gcg aga aac ctg gtc ttc cac ctg aag aag ggc tac atg 931  
Val Asp Val Ala Arg Asn Leu Val Phe His Leu Lys Lys Gly Tyr Met  
265 270 275

att gtc aag tgc agg ggc cag cag gac atc cag gag cag ctg agc ctg 979  
Ile Val Lys Cys Arg Gly Gln Gln Asp Ile Gln Glu Gln Leu Ser Leu  
280 285 290

gcc aag gcc ctg cag aag gag cag gcc ttc ttt gaa aac cac gca cat 1027  
Ala Lys Ala Leu Gln Lys Glu Gln Ala Phe Phe Glu Asn His Ala His  
295 300 305

ttc agg gat ctt ctg gag gaa ggg cgg gcc acg atc ccc tgc ctg gca 1075  
Phe Arg Asp Leu Leu Glu Glu Gly Arg Ala Thr Ile Pro Cys Leu Ala



310

315

320

325

gaa aga ctg acc tct gaa ctc atc atg cac atc tgt aaa act ctg ccc 1123

Glu Arg Leu Thr Ser Glu Leu Ile Met His Ile Cys Lys Thr Leu Pro

330

335

340

ctg tta gaa aac caa ata aaa gag agt cac cag aaa ata aca gag gag 1171

Leu Leu Glu Asn Gln Ile Lys Glu Ser His Gln Lys Ile Thr Glu Glu

345

350

355

tta cag aag tat ggc tcc gat att cca gag gat gaa agc ggg aag atg 1219

Leu Gln Lys Tyr Gly Ser Asp Ile Pro Glu Asp Glu Ser Gly Lys Met

360

365

370

ttt ttt ctg ata gat aaa atc gat gca ttt aat agt gat atc act gct 1267

Phe Phe Leu Ile Asp Lys Ile Asp Ala Phe Asn Ser Asp Ile Thr Ala

375

380

385

ttg ata caa gga gag gaa ctg gtg gtg gag tac gag tgt cgg ctg ttt 1315

Leu Ile Gln Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Tyr Glu Cys Arg Leu Phe

390

395

400

405

acc aag atg cga aat gag ttc tgc aga tgg agt gct gtg gtt gaa aag 1363

Thr Lys Met Arg Asn Glu Phe Cys Arg Trp Ser Ala Val Val Glu Lys

410

415

420

aat ttc aaa aat ggt tat gac gcc ata tgt aaa caa atc cag ctc ttc 1411

Asn Phe Lys Asn Gly Tyr Asp Ala Ile Cys Lys Gln Ile Gln Leu Phe

425

430

435

gaa aat cag tac agg ggg aga gag ttg cca ggg ttt gtg aat tat aag 1459

Glu Asn Gln Tyr Arg Gly Arg Glu Leu Pro Gly Phe Val Asn Tyr Lys

440

445

450

aca ttt gaa acc atc att aag aag cag gtc agt gtc ctg gaa gag cca 1507

Thr Phe Glu Thr Ile Ile Lys Lys Gln Val Ser Val Leu Glu Glu Pro

455

460

465

gcc gtg gac atg ctg cac aca gtg act gat tta gtc cgg ctc gcc ttc 1555

Ala Val Asp Met Leu His Thr Val Thr Asp Leu Val Arg Leu Ala Phe

470

475

480

485

aca gat gtt tca gaa aca aat ttt aat gaa ttt ttc aac ctc cac aga 1603

Thr Asp Val Ser Glu Thr Asn Phe Asn Glu Phe Phe Asn Leu His Arg

490

495

500

act gcc aag tcc aaa att gaa gac att aaa tta gaa caa gaa aaa gaa 1651

Thr Ala Lys Ser Lys Ile Glu Asp Ile Lys Leu Glu Gln Glu Lys Glu

505

510

515

gct gag acg tcg atc cgg ctc cac ttc caa atg gag cag atc gtg tac 1699

Ala Glu Thr Ser Ile Arg Leu His Phe Gln Met Glu Gln Ile Val Tyr

520

525

530

tgc cag gac cag gtc tat cgg ggc gcg ctg cag aag gtc aga gag aag 1747

Cys Gln Asp Gln Val Tyr Arg Gly Ala Leu Gln Lys Val Arg Glu Lys

535

540

545

gag gcg gaa gaa gaa aag aac aga aaa tca aac cag tac ttt ctg tcg 1795  
 Glu Ala Glu Glu Glu Lys Asn Arg Lys Ser Asn Gln Tyr Phe Leu Ser  
 550 555 560 565

tcg ccg gcc ccc tcc tca gac ccc tcc ata gcc gag atc ttt cag cac 1843  
 Ser Pro Ala Pro Ser Ser Asp Pro Ser Ile Ala Glu Ile Phe Gln His  
 570 575 580

ctg att gcc tac cat cag gag gtc ggc aag cgc atc tcc agc cac atc 1891  
 Leu Ile Ala Tyr His Gln Glu Val Gly Lys Arg Ile Ser Ser His Ile  
 585 590 595

cct ctg atc atc cag ttc ttc atc ctc cgg acc ttt ggg cag cag ctg 1939  
 Pro Leu Ile Ile Gln Phe Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gln Leu  
 600 605 610

cag aag agc atg ctg cag ctg ctg cag aac aag gac caa tac gac tgg 1987  
 Gln Lys Ser Met Leu Gln Leu Leu Gln Asn Lys Asp Gln Tyr Asp Trp  
 615 620 625

ctc ctg agg gag cgc agt gac acc agc gac aag agg aag ttc ctg aag 2035  
 Leu Leu Arg Glu Arg Ser Asp Thr Ser Asp Lys Arg Lys Phe Leu Lys  
 630 635 640 645

gag cgg ctg atg cgg ctg acc cag gct cgg cgc cgg ctc gcc aag ttc 2083  
 Glu Arg Leu Met Arg Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Leu Ala Lys Phe  
 650 655 660

cca ggc tga accggactct ccaggcggcc cggggtctcc agggcacgtc 2132

Pro Gly

tccaggcaac gaggaccaac ctccttcctt aacagactag catcatgagc tcctgtttcg 2192  
cacatcctcc tgtgggttagt agactctaaa gccaccgtcc ctgctgtagg tggctgagga 2252  
cttagcaaga agctgtgata agcacgctgg ctgcaagcat caggccattt acttgaatga 2312  
gccccgcaa cgcttcgcct cccgcgcctc tctccatccc tctctccatc cttctctcca 2372  
tcctgtata ggatactggg cccgcgatag catcatagaa gggtcattct ggtttctgta 2432  
caagcctttc acgccaatg tcttaggggc attacagcca cctgtgtgga tggatgcaca 2492  
tagaagccta tttcttttat ttgtaataaa cttggttcta ccagcaaaaa aaa 2545

<210> 2

<211> 663

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 2

Met	Val	Tyr	Ser	Ser	Cys	Glu	Ser	Lys	Glu	Pro	Asp	Ser	Val	Ser	Ala
1				5					10					15	
Ser	Asn	His	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Asn	Asp	Glu	Leu	Val	Glu	Lys	Ser
			20					25					30		
His	Lys	Thr	Gly	Pro	Glu	Asn	Asn	Leu	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Glu	Glu	Lys
			35					40					45		

Val Arg Pro Cys Ile Asp Leu Ile Asp Ser Leu Arg Ala Leu Gly Val  
50 55 60  
Glu Gln Asp Leu Ala Leu Pro Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gln Ser  
65 70 75 80  
Ser Gly Lys Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Gly Val Ala Leu Pro  
85 90 95  
Arg Gly Ser Gly Ile Val Thr Arg Cys Pro Leu Val Leu Lys Leu Lys  
100 105 110  
Lys Leu Val Asn Glu Glu Asp Glu Trp Lys Gly Lys Val Ser Tyr Arg  
115 120 125  
Asp Ser Glu Ile Glu Leu Ser Asp Ala Ser Gln Val Glu Lys Glu Val  
130 135 140  
Ser Ala Ala Gln Ile Ala Ile Ala Gly Glu Gly Val Gly Ile Ser His  
145 150 155 160  
Glu Leu Ile Ser Leu Glu Val Ser Ser Pro His Val Pro Asp Leu Thr  
165 170 175  
Leu Ile Asp Leu Pro Gly Ile Thr Arg Val Ala Val Gly Asn Gln Pro  
180 185 190  
Tyr Asp Ile Glu Tyr Gln Ile Lys Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Cys  
195 200 205  
Lys Gln Glu Thr Ile Asn Leu Val Val Val Pro Cys Asn Val Asp Ile  
210 215 220  
Ala Thr Thr Glu Ala Leu Arg Met Ala Gln Glu Val Asp Pro Glu Gly  
225 230 235 240  
Asp Arg Thr Ile Gly Ile Leu Thr Lys Pro Asp Leu Val Asp Lys Gly  
245 250 255  
Thr Glu Asp Lys Ile Val Asp Val Ala Arg Asn Leu Val Phe His Leu  
260 265 270  
Lys Lys Gly Tyr Met Ile Val Lys Cys Arg Gly Gln Gln Asp Ile Gln

275	280	285
Glu Gln Leu Ser Leu Ala Lys Ala Leu Gln Lys Glu Gln Ala Phe Phe		
290	295	300
Glu Asn His Ala His Phe Arg Asp Leu Leu Glu Glu Gly Arg Ala Thr		
305	310	315
Ile Pro Cys Leu Ala Glu Arg Leu Thr Ser Glu Leu Ile Met His Ile		
325	330	335
Cys Lys Thr Leu Pro Leu Leu Glu Asn Gln Ile Lys Glu Ser His Gln		
340	345	350
Lys Ile Thr Glu Glu Leu Gln Lys Tyr Gly Ser Asp Ile Pro Glu Asp		
355	360	365
Glu Ser Gly Lys Met Phe Phe Leu Ile Asp Lys Ile Asp Ala Phe Asn		
370	375	380
Ser Asp Ile Thr Ala Leu Ile Gln Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Tyr		
385	390	395
Glu Cys Arg Leu Phe Thr Lys Met Arg Asn Glu Phe Cys Arg Trp Ser		
405	410	415
Ala Val Val Glu Lys Asn Phe Lys Asn Gly Tyr Asp Ala Ile Cys Lys		
420	425	430
Gln Ile Gln Leu Phe Glu Asn Gln Tyr Arg Gly Arg Glu Leu Pro Gly		
435	440	445
Phe Val Asn Tyr Lys Thr Phe Glu Thr Ile Ile Lys Lys Gln Val Ser		
450	455	460
Val Leu Glu Glu Pro Ala Val Asp Met Leu His Thr Val Thr Asp Leu		
465	470	475
Val Arg Leu Ala Phe Thr Asp Val Ser Glu Thr Asn Phe Asn Glu Phe		
485	490	495
Phe Asn Leu His Arg Thr Ala Lys Ser Lys Ile Glu Asp Ile Lys Leu		
500	505	510

Glu Gln Glu Lys Glu Ala Glu Thr Ser Ile Arg Leu His Phe Gln Met  
515 520 525

Glu Gln Ile Val Tyr Cys Gln Asp Gln Val Tyr Arg Gly Ala Leu Gln  
530 535 540

Lys Val Arg Glu Lys Glu Ala Glu Glu Glu Lys Asn Arg Lys Ser Asn  
545 550 555 560

Gln Tyr Phe Leu Ser Ser Pro Ala Pro Ser Ser Asp Pro Ser Ile Ala  
565 570 575

Glu Ile Phe Gln His Leu Ile Ala Tyr His Gln Glu Val Gly Lys Arg  
580 585 590

Ile Ser Ser His Ile Pro Leu Ile Ile Gln Phe Phe Ile Leu Arg Thr  
595 600 605

Phe Gly Gln Gln Leu Gln Lys Ser Met Leu Gln Leu Leu Gln Asn Lys  
610 615 620

Asp Gln Tyr Asp Trp Leu Leu Arg Glu Arg Ser Asp Thr Ser Asp Lys  
625 630 635 640

Arg Lys Phe Leu Lys Glu Arg Leu Met Arg Leu Thr Gln Ala Arg Arg  
645 650 655

Arg Leu Ala Lys Phe Pro Gly  
660

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 3

ctgaaagatc tcggctatgg agg

23

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 4

aagaagctga gacgtcgatc cggct

25

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 5



aagcgcatct ccagccacat c

21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 6

aagacattgg gcgtgaaagg

20

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg tcacagcgtc aaagaaaagg aag

53

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 8

ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtc cttctatgat gctatgcgg

49

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 9

agtgacagga gcgacaagag

20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 10

cctggagagt ccggttca

18

【図面の簡単な説明】

【図 1】 肥育生産用の 3 元交雑豚の写真である。

【図 2】 MOI 1における、Mx1遺伝子型とウイルス抑制能との関係を示すグラフである。

【図 3】 MOI 10における、Mx1遺伝子型とウイルス抑制能との関係を示すグラフである。

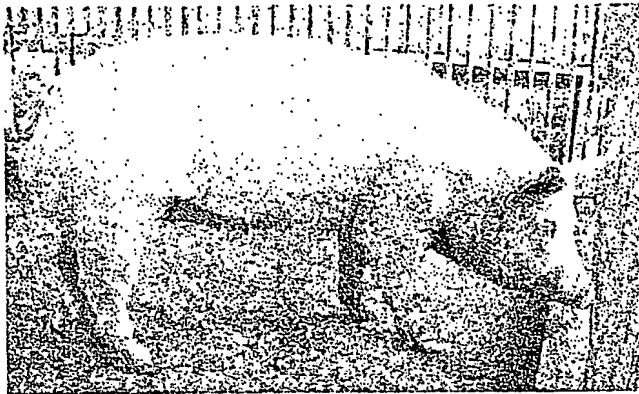
【図 4】 3T3細胞、及び3T3-0、3T3-3、3T3-11の各形質転換細胞におけるMx1の発現量の比較を、RT-PCRによって行った結果を示す写真である。

【図 5】 ブタMx1遺伝子最終エクソンにおける「11bpの欠損」領域、および該領域を増幅するためのプライマーセットの塩基配列を示す図である。

【図 6】 PCR増幅によるブタMx1遺伝子の最終エクソンにおける11塩基欠損の検出を示す写真である。

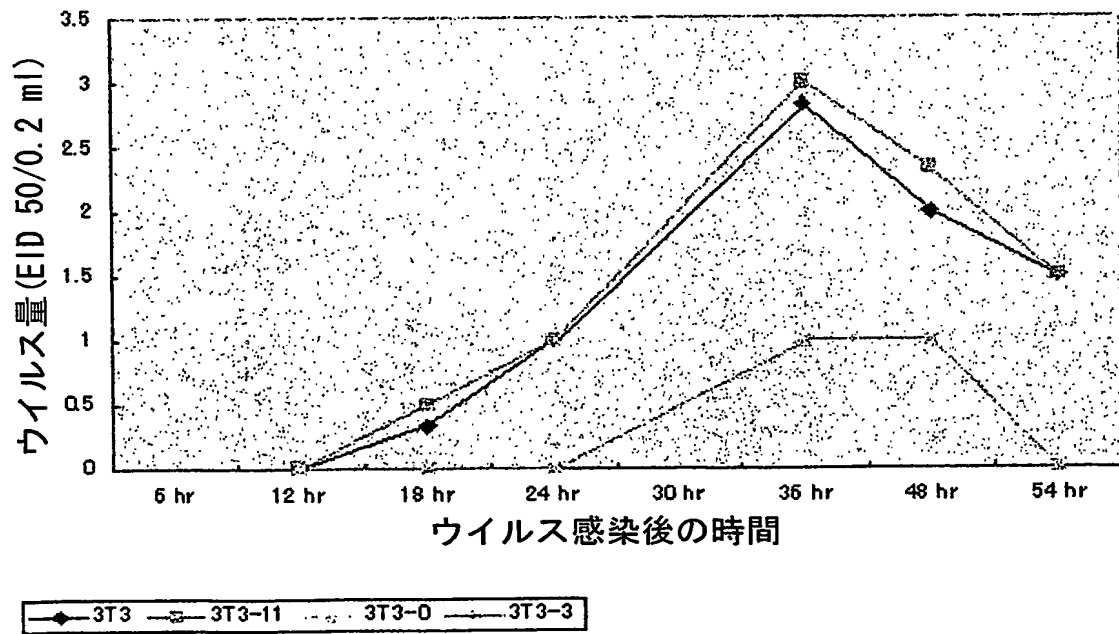
【書類名】 図面

【図 1】

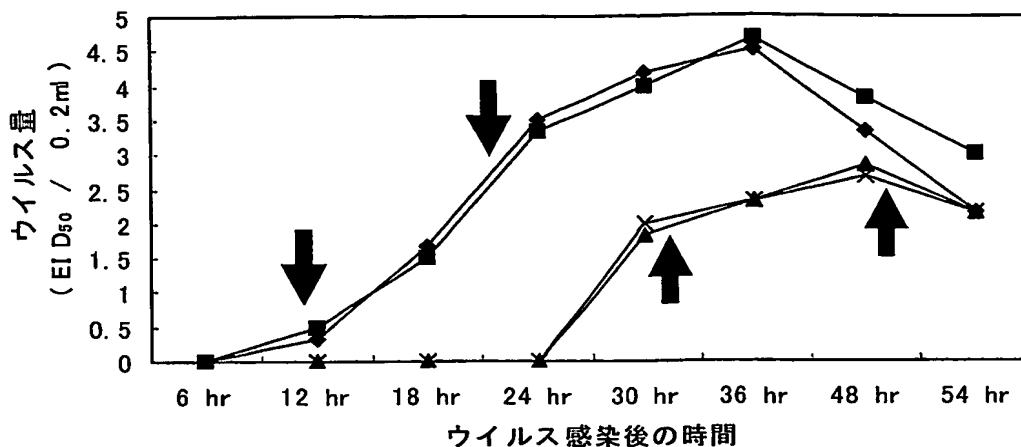


【図 2】

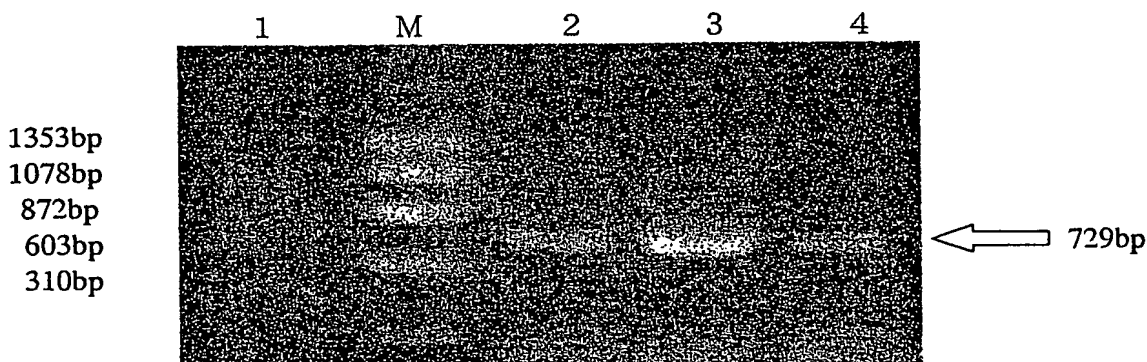
MOI 1



【図 3】



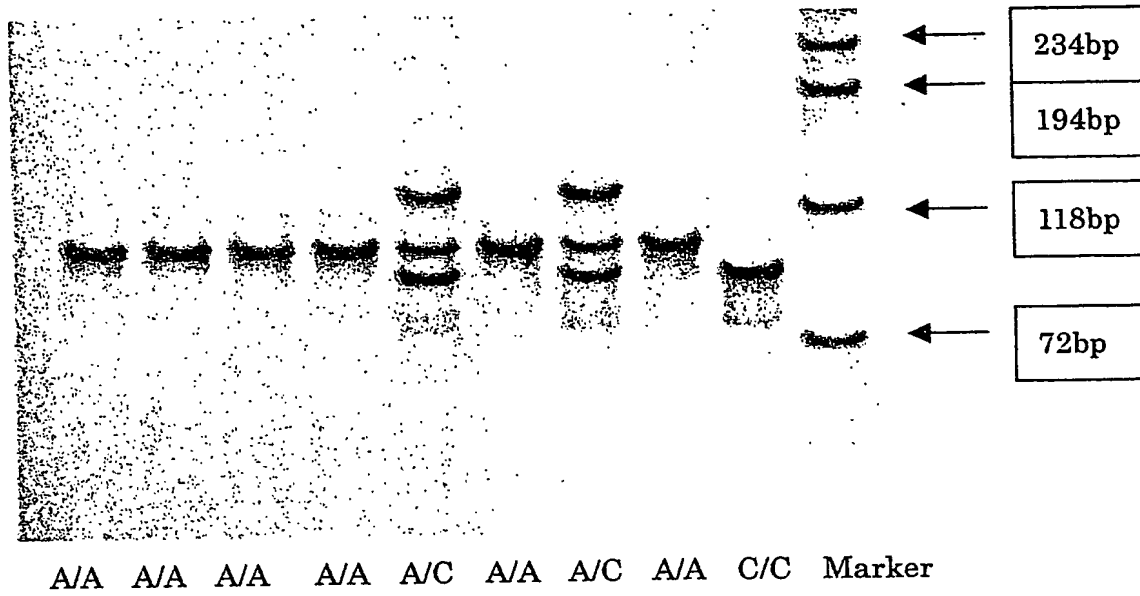
【図 4】



【図 5】

CGACTGGCTC	CTGAGGGAGC	GCAGTGACAC	CAGCGACAAG	AGGAAGTTCC	TGAAGGAGCG
プライマー F					
GCTGATGCGG	CTGACCCAGG	CTCGGCGCGG	GCTCGCCAAG	TTCCAGGCT	GAACCGGACT
11-bp 欠損					
プライマー R					
CTCCAGGCGG	CCCGGGGTCT	CCAGGGCACG	TCTCCAGGCA	ACGAGGACCA	ACCTCCTTCC

【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ブタについてRNAウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 ブタMx1遺伝子において、ミクソウイルスの1種であるインフルエンザウイルスの増殖抑制能が11塩基の欠損にどのように影響されるかについて研究を行い、11塩基欠損型はウイルス増殖抑制能を全く失っていることを明らかにした。ブタについて該11塩基の欠損を検出することにより、インフルエンザウイルス抵抗性の判定を行うことができる。

【選択図】 なし

特願2002-313076

出願人履歴情報

識別番号

[501167644]

1. 変更年月日

2001年 4月24日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

氏 名

独立行政法人農業生物資源研究所



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**